8 月 August
2019, 62(8): 937 - 947
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.08.006

斯氏按蚊中 Toll 受体参与抵抗微生物感染和调控肠道菌群稳态

孙佩璐[1,2]，崔春来[2]，宋红生[1,*]，王四宝[2,*]

（1. 上海大学生命科学学院，上海 200444；2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所，上海 200032）

摘要：【目的】Toll 信号通路是昆虫天然免疫系统的重要组分，其中 Toll 受体在激活昆虫病原菌侵染免疫应答方面发挥了关键作用。本研究旨在探究斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* Toll 受体基因在抵抗微生物侵染和维持肠道菌群稳态过程中的功能。【方法】根据冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Toll 受体家族的蛋白氨基酸序列，通过序列同源比对鉴定斯氏按蚊中相应的 Toll 受体基因；运用荧光定量 PCR 检测 Toll 受体基因在未感染病原菌的斯氏按蚊脂肪体中的相对表达量，以及在真菌球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和革兰氏阴性细菌胡萝卜软腐欧文氏菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 侵染斯氏按蚊过程中的表达变化；最后，在斯氏按蚊雌成蚊胸部显微注射 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 的双链 RNA 进行 RNA 干扰后，检测 RNAi 处理的斯氏按蚊受真菌侵染后的存活率、肠道细菌含量变化以及抗菌肽基因表达变化。【结果】在斯氏按蚊中共鉴定到 8 个 Toll 受体基因，即 *AsToll1A*, *AsToll5A*, *AsToll6*, *AsToll7*, *AsToll8*, *AsToll9*, *AsToll10* 和 *AsToll11*。通过荧光定量 PCR 检测发现，未感染病原菌的斯氏按蚊雌成蚊脂肪体中 *AsToll5A* 表达量最高，*AsToll1A* 表达量次之，其余 Toll 受体基因表达量极低。在球孢白僵菌和胡萝卜软腐欧文氏菌侵染过程中，与对照（注射 PBS）比较，*AsToll1A* 和 *AsToll5A* 在斯氏按蚊中的表达量显著升高，其余 Toll 受体基因表达变化不显著或降低。RNA 干扰结果表明，*AsToll1A* 或 *AsToll5A* 的表达受到抑制后，斯氏按蚊对球孢白僵菌的抵抗能力显著降低，肠道细菌总量与对照（ds*GFP*）比较显著增多。而且，抑制 *AsToll1A* 后抗菌肽基因 *DEF1* 和 *GAM1* 的表达受到显著抑制；抑制 *AsToll5A* 后仅有 *GAM1* 表达量下调。【结论】斯氏按蚊 Toll 受体在结构和功能上具有高度的保守性，其中 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 能响应病原真菌和革兰氏阴性细菌侵染并且影响肠道菌稳态。

关键词：斯氏按蚊；Toll 受体；球孢白僵菌；革兰氏阴性细菌；RNA 干扰；肠道细菌

中图分类号：Q966　**文献标识码**：A　**文章编号**：0454-6296(2019)08-0937-11

Toll receptors are involved in anti-microbial response and gut microbiota homeostasis in the malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae)

SUN Pei-Lu[1,2], CUI Chun-Lai[2], SONG Hong-Sheng[1,*], WANG Si-Bao[2,*] (1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract:【Aim】Toll signaling pathway is an important component of insect innate immunity. Toll receptors play a key role in activating the immune response to pathogen infection. This study aims to explore the function of Toll receptor genes in resistance to microbial infection and maintaining the

基金项目：国家自然科学基金项目(31772534)
作者简介：孙佩璐，女，1993 年生，河南郑州人，硕士研究生，研究方向为媒介昆虫与微生物相互作用，E-mail: sunpeilu2012@sina.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: hssong@shu.edu.cn; sbwang@sibs.ac.cn
收稿日期 Received: 2019-04-21；接受日期 Accepted: 2019-05-06

homeostasis of gut microbiota in *Anopheles stephensi*.【Methods】The Toll receptor genes in *An. stephensi* were identified by BLAST search using the published Toll sequences in *Anopheles gambiae*. The relative expression levels of Toll receptor genes in the fat body of healthy adults of *An. stephensi* and the adults infected with *Beauveria bassiana* and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) for different time were detected by real-time quantitative PCR. After the double-stranded RNA of *AsToll1A* or *AsToll5A* was microinjected into the thorax of female adults of *An. stephensi*, the survival rates of the RNAi-treated mosquitoes after fungal infection and the total gut bacterial load and the expression levels of antimicrobial peptide genes in the RNAi-treated mosquitoes were detected.【Results】Eight Toll receptor genes, *i. e.*, *AsToll1A*, *AsToll5A*, *AsToll*6, *AsToll*7, *AsToll*8, *AsToll*9, *AsToll*10 and *AsToll*11, were identified in *An. stephensi*. The real-time quantitative PCR analysis showed that *AsToll5A* had the highest expression level in the fat body of healthy female adults of the mosquito, followed by *AsToll1A*, and the expression levels of other Toll receptor genes in the fat body were extremely low. Compared to the control (injecting PBS), *B. bassiana* or *Ecc* infection significantly induced the transcription of *AsToll1A* and *AsToll5A*, whereas the expression levels of other Toll receptor genes during pathogen infection showed no significant change. Silencing *AsToll1A* or *AsToll5A* significantly reduced the resistance of *An. stephensi* adults to *B. bassiana* infection, and extremely significantly increased the total gut bacterial load in the adult midgut as compared to the ds*GFP*-treated control. Moreover, silencing *AsToll1A* remarkably inhibited the expression of antimicrobial peptide genes *DEF*1 and *GAM*1, while only the expression of *GAM*1 was down-regulated in the ds*AsToll5A*-injected mosquitoes.【Conclusion】The Toll receptors in *An. stephensi* are conserved in structure and function. *AsToll1A* and *AsToll5A* are highly induced in response to both fungal and Gram-negative bacterial infections, and also regulate the homeostasis of gut microbiota in *An. stephensi*.

Key words: *Anopheles stephensi*; Toll receptor; *Beauveria bassiana*; Gram-negative bacteria; RNA interference; gut bacteria

按蚊是疟疾传播的媒介,主要由雌性成蚊通过吸血传播疟原虫。疟疾是目前全球范围内最致命的蚊媒传染病,2017 年仍有 2.19 亿人感染疟疾,造成 43.5 万人死亡(WHO, 2018)。利用化学药剂灭蚊可以压低媒介蚊虫的数量,阻断病原传播,但是过量及持续使用杀虫剂导致目前世界各地都存在对一种或多种杀虫剂的抗性(Hemingway and Ranson, 2000; Etang *et al.*, 2016),因此亟需探索新的防蚊抗疟手段。蚊的免疫系统在抵御病原入侵和调节肠道菌群稳态中起重要作用(Bartholomay and Michel, 2018)。从攻克免疫防线出发,加强对蚊虫免疫机制的了解,可以为蚊媒传染病的防治提供新策略。

先天免疫系统是包括蚊在内的昆虫抵抗外源病原菌侵染的主要途径,由体液免疫及细胞免疫组成。基于模式生物黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中的研究,通常认为体液免疫中的 Toll 信号通路能够调控抗菌肽合成,用于抵抗真菌及革兰氏阳性细菌的侵染(Lemaitre *et al.*, 1996; Michel *et al.*, 2001; Buchon *et al.*, 2014),而 IMD 信号通路负责抵抗革兰氏阴性细菌侵染(Gottar *et al.*, 2002),只有零星报道推测革兰氏阴性菌雷氏普罗维登斯菌 *Providencia rettgeri* 的入侵会激活 Toll 通路(Duneau *et al.*, 2017)。Toll 受体最早在果蝇中被发现,最初发现的基因 *Toll*(即 *Toll*-1)是果蝇胚胎期腹背轴极性建立过程中的关键因子(Nüsslein-Volhard *et al.*, 1980; Anderson *et al.*, 1985a, 1985b),但随后发现 Toll 受体家族也参与免疫反应(Imler and Hoffmann, 2001)。目前已在果蝇基因组中鉴定出 9 个 Toll 受体基因,它们都编码由胞外富含亮氨酸的重复结构域(leucine rich repeat motif, LRR motif)和胞内 TIR (Toll/Interleukin-1 receptor)结构域组成的跨膜蛋白(Imler and Hoffmann, 2001)。从系统发育的角度而言,果蝇的 Toll-1 与 Toll-5(即 Tehao)进化关系最近,且在功能上都能激活抗菌肽基因的表达,它们的缺失突变会增加果蝇对真菌的敏感性(Lemaitre *et al.*, 1996; Tauszig *et al.*, 2000)。此外,Toll-5 被证明可以单独或者与 Toll-1 协同作用,依赖有激酶活性的接头蛋白 Pelle 激活下游的转录调控通路(Luo *et al.*, 2001)。在 *18-wheeler*(即 *Toll*-2)的缺失突变

体中也发现抗菌肽表达量降低，幼虫对细菌更加易感（Williams *et al.*, 1997）。另外，果蝇的 Toll-9 也被发现可以激活抗真菌肽基因的表达（Ooi *et al.*, 2002）。

在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中，根据果蝇 *Toll*-1 基因序列比对鉴定到了 *AaToll1A*，*AaToll1B* 和 *AaToll5A*，*AaToll5B*，发现它们都会被真菌诱导表达且受到伊蚊 Toll 信号通路中的转录因子 *Relish*1（*Rel*1）的影响（Shin *et al.*, 2006）。细胞中研究发现 AaToll1A 和 AaToll5A 可以激活抗菌肽基因 *drosomycin* 的启动子，这与果蝇中的研究结果（Luna *et al.*, 2003）一致。在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 基因组中注释了 10 个 Toll 受体家族基因（Christophides *et al.*, 2002），其中有研究预测 *AgToll5B* 的单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）可能与恶性疟原虫 *Plasmodium falciparum* 侵染有关（Horton *et al.*, 2010），而 *AgToll*6，*AgToll*8 以及 *AgToll*9 在感染病原菌后并无显著变化（Luna *et al.*, 2002）。

对于斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* Toll 受体家族基因在抵抗真菌侵染方面的功能研究之前鲜有报道，也并未发现斯氏按蚊 Toll 受体基因响应革兰氏阴性细菌侵染以及影响肠道菌群稳态。本研究通过与冈比亚按蚊基因组序列比对，鉴定到了斯氏按蚊 Toll 受体家族基因，之后利用荧光定量 PCR 检测了感染球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和胡萝卜软腐欧文氏菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*（*Ecc*）后 Toll 受体家族基因的表达变化，并利用 RNA 干扰（RNAi）的方法进一步确定了 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 在按蚊抵抗真菌感染以及调节肠道菌群稳态中具有重要作用。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

本研究使用的斯氏按蚊品系为 Dutch strain。饲养间环境温度 26 ± 1℃，相对湿度 80% ± 5%，光周期 12L∶12D。按蚊幼虫饲养于浅盆中，以猫粮为食，成年按蚊通过真空吸引设备吸入蚊笼，以 10% 蔗糖水溶液浸湿的脱脂棉球喂养。

1.2　Toll 受体基因序列比对与系统发生

根据媒介昆虫基因组数据库 VectorBase（https://www.vectorbase.org）中冈比亚按蚊 Toll 受体家族基因的 cDNA 和氨基酸序列，用 Blast 软件对比鉴定到斯氏按蚊中的 Toll 受体基因及氨基酸序列，设计引物（表 1）。利用 PFAM 数据库（http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam）和 NCBI 中的 Conserved Domains（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）预测斯氏按蚊 Toll 受体氨基酸序列中的保守结构域。利用软件 Clustal W 将黑腹果蝇、埃及伊蚊、冈比亚按蚊和斯氏按蚊的 Toll 受体进行氨基酸序列比对，采用邻接法（neighbor-joining method）使用 MEGA7 构建系统发育树，通过 bootstrap 值验证，自展次数设为 1 000。

1.3　病原菌感染斯氏按蚊

实验所用病原细菌为胡萝卜软腐欧文氏菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora*（*Ecc*），在 LB 培养基中于 30℃培养过夜，用 1 × PBS 缓冲液稀释至 OD = 1.0。所用病原真菌为球孢白僵菌 *B. bassiana*（ARSEF 252），接种到 SDAY（Sabouraud dextrose agar plus yeast extract）平板上于 28℃培养 14 d，用 1 × PBS配制的 0.01% Triton X-100 制备分生孢子悬液并稀释至 5×10^5 个/mL。用微量注射器 Nanoject II（Drummond）向羽化 3 – 4 d 的斯氏按蚊雌成蚊胸部注射稀释后的病原细菌或真菌，每头注射 69 nL。对照组按蚊仅注射 1 × PBS 缓冲液。感染病原细菌的按蚊与对照组分别在注射后 0, 3, 8 和 24 h 解剖脂肪体提取 RNA，感染病原真菌的按蚊与对照组分别在感染后 0, 6, 24 和 48 h 解剖脂肪体提取 RNA，每个处理取样 25 ~ 30 头雌成蚊，试验重复 3 次。

1.4　总 RNA 提取与 cDNA 合成

在冰上解剖未感染病原菌的斯氏按蚊雌成蚊 25 头及 1.3 节感染病原菌的按蚊的脂肪体，置于 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中，加入陶瓷珠和 500 μL RNAiso Plus（TaKaRa）研磨破碎，之后按照说明书提取组织中总 RNA。提取的总 RNA 浓度和纯度用 BioPhotometer（Eppendorf）测定，琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样本完整性。使用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser（TaKaRa）进行逆转录反应，该试剂盒分为去除 gDNA 和逆转录两步。去除 gDNA 的反应体系 10 μL，其中 RNA 样品 1 μg，反应程序：42℃ 2 min。逆转录反应体系 20 μL，反应程序：37℃ 15 min，85℃ 5 s。详细步骤参照产品说明书。

1.5　实时荧光定量 PCR 检测 Toll 受体基因表达

将 1.4 节所得 cDNA 稀释 2 倍后作为模板，使用 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix（No Rox）（YEASEN）试剂盒进行 qPCR 反应，仪器为 PikoReal

(Thermo Fisher)。反应体系(10 μL):2 × Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL,cDNA 1 μL,无菌双蒸水 3.6 μL。反应条件:预变性 95℃ 5 min;变性 95℃ 10 s,退火/延伸 60℃ 30 s,共 40 个循环。使用 PikoReal Software 2.2 记录和分析实验数据,生成熔解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量。

1.6 双链 RNA 合成与注射

用于合成 ds*AsToll1A*,ds*AsToll5A* 和 ds*GFP* 的引物的 5′端设计有一段 T7 启动子序列(表 1),分别以斯氏按蚊 cDNA、质粒 pBar-*GFP* 为模板,使用高保真酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme) PCR 扩增得到用于合成 dsRNA 的模板,反应体系(50 μL):2 × Phanta Max Buffer 25 μL,dNTP Mix (10 mmol/L each) 1 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL,Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL,cDNA 模板 5 μL,无菌双蒸水 14 μL。PCR 反应程序:预变性 95℃ 3 min;变性 95℃ 15 s,退火 60℃ 15 s,延伸 72℃ 30 s,35 个循环;彻底延伸 72℃ 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,使用 Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek) 试剂盒进行胶回收。以 PCR 产物为模板,使用 MEGAscript RNAi Kit (Ambion) 合成 ds*AsToll1A*,ds*AsToll5A* 和 ds*GFP*,具体步骤参照产品说明书。所得 dsRNA 调整浓度至 3 μg/μL,使用微量注射器向羽化第 1 天的斯氏按蚊雌成蚊胸侧面注射 69 nL,25~30 头健康雌成蚊设为 1 组,进行 3 次生物学重复。3 d 后按照 1.4 节的方法解剖斯氏按蚊雌成蚊脂肪体提取总 RNA 逆转录合成 cDNA,按照 1.5 节的方法进行实时荧光定量 PCR,检测 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 的 RNA 干扰效率。

1.7 实时荧光定量 PCR 测定 RNAi 对斯氏按蚊抗菌肽基因表达的影响

以 1.6 节合成的斯氏按蚊雌成蚊 cDNA 为模板,按照 1.5 节的方法进行实时荧光定量 PCR 检测 RNAi 干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 后对主要抗菌肽基因 *CEC*1 (VectorBase 序列号:ASTE007107),*DEF*1 (VectorBase 序列号:ASTE011281),*ATT* (VectorBase 序列号:ASTE009529) 和 *GAM*1 (VectorBase 序列号:ASTE002252) 表达的影响。本实验进行 3 次生物学重复。

1.8 RNAi 后病原真菌感染斯氏按蚊生存曲线测定

25~30 头健康雌成蚊设为 1 组,分别按照 1.6 节的方法注射 ds*GFP*,ds*AsToll1A* 和 ds*AsToll5A*。3 d后按照 1.3 节的方法制备球孢白僵菌浓度为 5×10^5 个/mL 的分生孢子孢悬液,通过胸部注射孢悬液感染 RNAi 干扰后的斯氏按蚊,感染后每 0.5 d 统计每组生存情况。使用 GraphPad Prism 绘制生存曲线,采用 Log Rank 检验方法进行显著性分析。

1.9 实时荧光定量 PCR 测定 RNAi 后斯氏按蚊肠道细菌含量

利用实时荧光定量 PCR 对比细菌标志基因 16S rRNA 和按蚊内参基因 *S7* 的相对表达量(引物序列见表 1),测定 RNAi 干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 后按蚊肠道细菌含量。分别取 1.6 节注射 ds*AsToll1A*,ds*AsToll5A* 和 ds*GFP* 3 d 后的 15 头斯氏按蚊雌成蚊的中肠,置于含有 100 μL 无菌 1 × PBS 的离心管中,用手持匀浆器研磨破碎,之后使用试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 提取按蚊中肠混合 DNA。以总 DNA 样本为模板,按照 1.5 节的操作步骤进行实时荧光定量 PCR 反应。本实验进行 3 次生物学重复。

1.10 数据分析

实验数据使用 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism 进行数据处理及分析,采用 *T* 检验进行比较,分析实验组与对照组之间的基因表达量差异。

2 结果

2.1 斯氏按蚊 Toll 受体基因鉴定分析

根据冈比亚按蚊基因组中 Toll 受体基因的碱基及氨基酸序列,利用 Blast 软件比对到斯氏按蚊中序列相似性最高的 8 个基因:*AsToll1A* (VectorBase 序列号:ASTE016386),*AsToll5A* (VectorBase 序列号:ASTE016385),*AsToll*6 (VectorBase 序列号:ASTE004591),*AsToll*7 (VectorBase 序列号:ASTE000234),*AsToll*8 (VectorBase 序列号:ASTE004593),*AsToll*9 (VectorBase 序列号:ASTE010442),*AsToll*10 (VectorBase 序列号:ASTE004926) 和 *AsToll*11 (VectorBase 序列号:ASTE004928)。在 PFAM 数据库及 NCBI 中预测保守结构域,发现斯氏按蚊 Toll 受体家族的蛋白质二级结构非常相似,均包含胞外富含亮氨酸的重复结构域和胞内保守的 TIR 结构域(图 1)。

采用邻接法构建系统发育进化树,分析斯氏按蚊与已经鉴定到的冈比亚按蚊、埃及伊蚊、黑腹果蝇的 Toll 受体家族进化关系(图 2)。结果显示斯氏按蚊的 Toll 受体家族成员与相应的冈比亚按蚊 Toll 受

表 1　研究所用引物
Table 1　Primers used in this study

引物 Primers	引物序列（5′－3′） Primer sequences	引物用途 Primer usage
AsToll1A-F	ACACGCTCCATCTGCAATCA	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
AsToll1A-R	TCTTGGTACCGTTGTCAGCC	
AsToll5A-F	TAATCCACTAAACTGCGACTGTCTG	
AsToll5A-R	GCTCCGTGCTTGGTACATCG	
AsToll6-F	ATCAGCTCAAACCGACTGCA	
AsToll6-R	GCGCCTTATCCCCTACCATC	
AsToll7-F	GTTTGTGTTCCGTGAGCCAC	
AsToll7-R	CCGTTTGCAGGAAGTTACGC	
AsToll8-F	AACCCCTACCAGTGCGATTG	
AsToll8-R	AACAGTGACAGAGGGCGAAG	
AsToll9-F	GACCCAACCGACTGTGATGT	
AsToll9-R	CCTTCCATCCTGTGTCACCC	
AsToll10-F	TCTCAACCTGGAAGCGAACC	
AsToll10-R	TCAAGACCCTCGAACGAAGC	
AsToll11-F	GCCTACCTGCGTCAGTATCC	
AsToll11-R	GACTCCCAGGCCGTATCATG	
CEC1-F	GGAAGCGGGACGCCTGAA	
CEC1-R	CCTTGACACCTGCCACCACC	
DEF1-F	AGTCGTGGTCCTGGCGGCTCT	
DEF1-R	ACGAGCGATGCAATGCGCGGCA	
ATT-F	AAAGCCAGAGCGGCAACAC	
ATT-R	TCAGTAACCGTGCGTGAAAGTC	
GAM1-F	GTACGTCAGCCGGAAGGGAG	
GAM1-R	CGTAATGAACGAGGACGAACAGC	
16S rRNA-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	
16S rRNA-R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
S7-F	TCGGTTCCAAGGTGATCAAAGC	
S7-R	AGCGCGGTCTCTTCTGCTTGT	
dsAsToll1A-F	TAATACGACTCACTATAGGGTGACGTTCGCTCACAAGAAC	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
dsAsToll1A-R	TAATACGACTCACTATAGGGGGAAGCTGCTGGAAAGTACG	
dsAsToll5A-F	TAATACGACTCACTATAGGGTGTCACATTGCAGAGCTTCC	
dsAsToll5A-R	TAATACGACTCACTATAGGGGATCTCGTTGTGGGACAGGT	
dsGFP-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT	
dsGFP-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	

体成员为直系同源基因，说明斯氏按蚊 Toll 受体与冈比亚按蚊 Toll 受体的同源性最高。斯氏按蚊中的 6 个 Toll 受体（AsToll6－11）能够分别与冈比亚按蚊、埃及伊蚊、黑腹果蝇的 Toll 受体聚集成簇。但是按蚊与伊蚊中都没有与果蝇 18-wheeler（即 Toll-2），MstProX（即 Toll-3）和 Toll-4 同源的 Toll 受体。斯氏按蚊中也没有与冈比亚按蚊 AgToll1B 和 AgToll5B 同源的 Toll 受体。

2.2　斯氏按蚊 Toll 受体家族基因在雌成蚊脂肪体中的表达量

实时荧光定量 PCR 检测发现，斯氏按蚊 Toll 受体基因家族中 *AsToll5A* 在雌成蚊的脂肪体中表达量最高，*AsToll1A* 表达量次之，其余 Toll 受体基因表达量极低（图 3）。

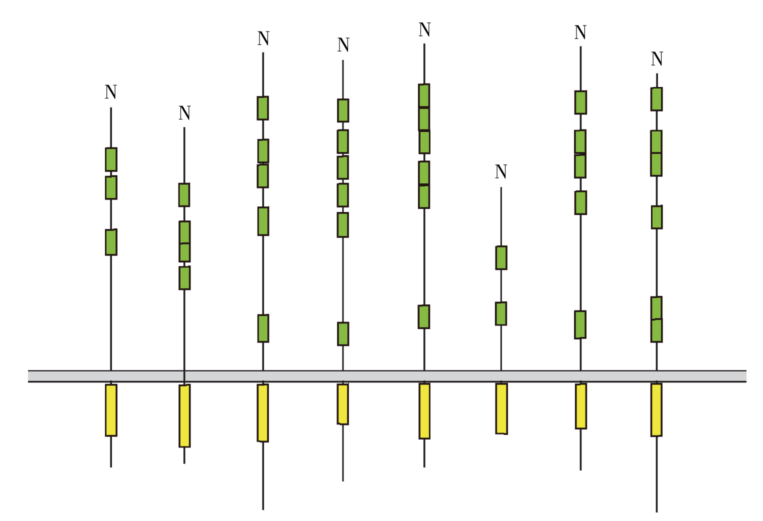


图 1 斯氏按蚊 Toll 受体家族蛋白质结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of protein structures of Toll receptor family in *Anopheles stephensi*

绿色长方形区域代表 LRR 结构域,黄色长方形区域代表 TIR 结构域,灰色带状区域代表细胞膜。The green rectangles represent leucine-rich repeat motifs. The yellow rectangles represent Toll/Interleukin-1 receptor domain. Plasma membrane is shown as a grey band.

AgToll10 AGAP011187
AsToll10 ASTE004926
AaToll10 AAEL004000
AaToll11 AAEL009551
AgToll11 AGAP011186
AsToll11 ASTE004928
Dm18-wheel CG8896
DmToll-7 CG8595
AaToll7 AAEL002583
AgToll7 AGAP012326
AsToll7 ASTE000234
DmToll-6 CG7250
AaToll6 AAEL000671
AgToll6 AGAP012387
AsToll6 ASTE004591
DmTollo CG6890
AaToll8 AAEL000633
AgToll8 AGAP012385
AsToll8 ASTE004593
CG1149 DmMstProx
CG18241 DmToll-4
CG7121 DmTehao
CG5490 DmToll
AAEL000057 AaToll5B
AAEL007613 AaToll1A
AAEL003507 AaToll1B
AAEL007619 AaToll5A
AGAP001004 AgToll1A
ASTE016386 AsToll1A
ASTE016385 AsToll5A
AGAP000999 AgToll5A
AGAP010636 AgToll1B
AGAP010669 AgToll5B
CG5528 DmToll-9
AAEL013441 AaToll9A
AGAP006974 AgToll9
ASTE010442AsToll9
0.2

图 2 基于氨基酸序列构建的斯氏按蚊及其他双翅目昆虫 Toll 受体的系统进化树(邻接法, 1 000 次重复)

Fig. 2 Phylogenetic tree of Toll receptors from *Anopheles stephensi* and other dipteran insects based on amino acid sequences by using the neighbor-joining method (1 000 replicates)

As: 斯氏按蚊(红色)*Anopheles stephensi* (in red); Ag: 冈比亚按蚊(绿色)*Anopheles gambiae* (in green); Aa: 埃及伊蚊(蓝色)*Aedes aegypti* (in blue); Dm: 黑腹果蝇(黑色)*Drosophila melanogaster* (in black).

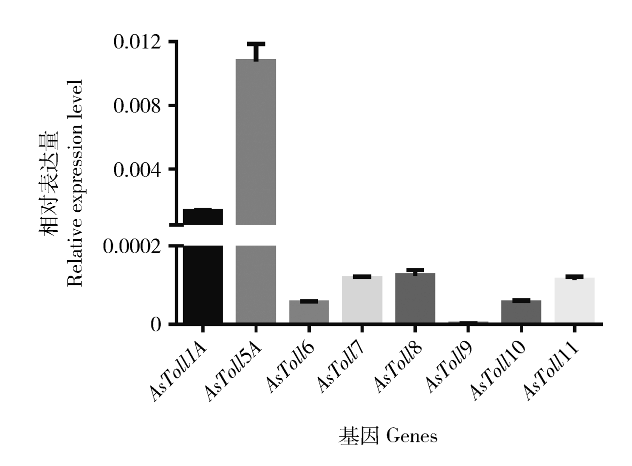


图 3　斯氏按蚊雌成蚊脂肪体中 Toll 受体基因的相对表达量

Fig. 3　Relative expression levels of Toll receptor genes in the fat body of female adults of *Anopheles stephensi*

2.3　病原菌侵染过程中斯氏按蚊 Toll 受体家族基因表达变化

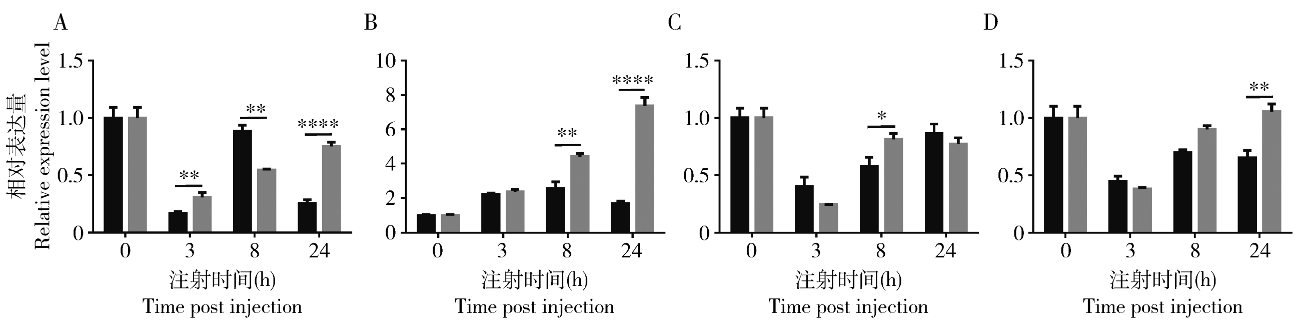
利用实时荧光定量 PCR 验证斯氏按蚊 Toll 受体基因在抵抗病原菌侵染过程中的功能，感染真菌球孢白僵菌后发现（图 4），与对照（注射 PBS）相比，雌成蚊脂肪体内 Toll 受体基因 *AsToll1A* 仅在侵染后 48 h 表达量显著升高（$P<0.001$）；*AsToll5A* 分别在侵染后 24 h（$P<0.001$）和 48 h（$P<0.0001$）表达量显著和极显著地升高；*AsToll7* 同样在侵染后 48 h 表达量显著升高（$P<0.001$）；*AsToll8* 在感染后 24 h（$P<0.01$）和 48 h（$P<0.01$）表达量显著升高；*AsToll10* 在感染后 6 h 就有响应（$P<0.01$），到真菌感染后 24 h（$P<0.001$）和 48 h（$P<0.05$）其表达量仍显著升高；*AsToll6*，*AsToll9* 和 *AsToll11* 并不响应球孢白僵菌侵染。

图 4　球孢白僵菌侵染后斯氏按蚊雌成蚊脂肪体内 Toll 受体基因表达模式

Fig. 4　Expression patterns of Toll receptor genes in the fat body of female adults of *Anopheles stephensi* after infection with *Beauveria bassiana*

A：*AsToll1A*；B：*AsToll5A*；C：*AsToll6*；D：*AsToll7*；E：*AsToll8*；F：*AsToll9*；G：*AsToll10*；H：*AsToll11*. 图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差；柱上单星号、双星号、三星号、四星号分别表示同一时间点与对照组（注射 PBS）之间差异显著性为 $P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$ 和 $P<0.0001$（*T* 检验）。图 5 同。Data in the figure are mean ± *SD* of three independent experiments. Single asterisk, double asterisk, triple asterisk and quadruple asterisk above bars indicate significant difference from the control (injecting PBS) at the same time point at the 0.05, 0.01, 0.001 and 0.0001 level, respectively (*T*-test). The same for Fig. 5.

感染细菌胡萝卜软腐欧文氏菌后发现（图 5），与对照相比，*AsToll1A* 在感染后 3 h 就有响应（$P<0.01$），到 24 h 表达量升高极显著（$P<0.0001$）；*AsToll5A* 分别在侵染后 8 h（$P<0.01$）和 24 h（$P<$



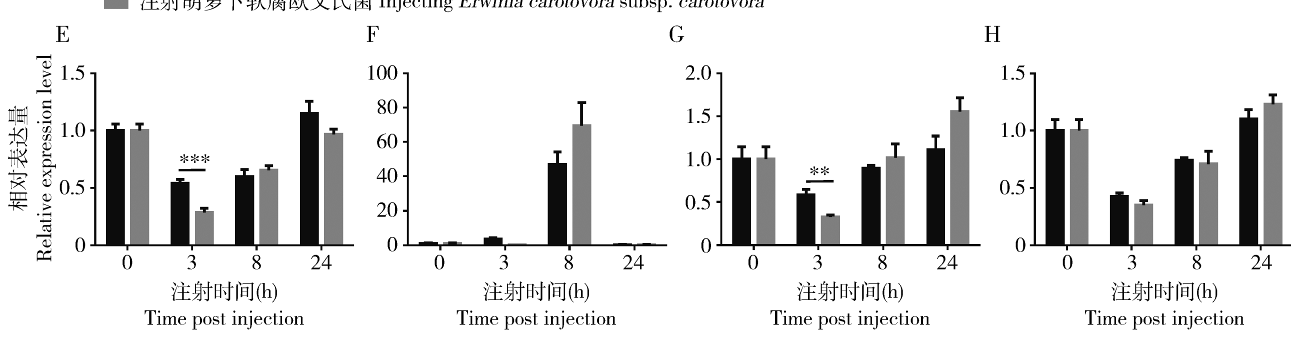


图 5　革兰氏阴性菌胡萝卜软腐欧文氏菌侵染后斯氏按蚊雌成蚊脂肪体内 *Toll* 受体基因表达模式

Fig. 5　Expression patterns of Toll receptor genes in the fat body of female adults of *Anopheles stephensi* after infection with Gram-negative bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

0.0001)表达量显著和极显著地升高；*AsToll*6 和 *AsToll*7 分别在感染后 8 h($P<0.05$)和 24 h($P<0.01$)显著和极显著升高；*AsToll*8($P<0.001$)和 *AsToll*10($P<0.01$)反而在感染后 3 h 下降；*AsToll*9 和 *AsToll*11 并不响应胡萝卜软腐欧文氏菌侵染。

2.4　RNAi 干扰 *AsToll1A* 或 *AsToll5A* 对斯氏按蚊抵抗病原菌侵染能力的影响

为验证 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 的功能，向雌性成蚊注射 ds*AsToll1A* 和 ds*AsToll5A*，注射 ds*GFP* 作为对照，3 d 后检测抑制效果。如图 6(A)显示，斯氏按蚊体内 *AsToll1A* 的表达量受到显著抑制($P<0.01$)，图 6(B)表明 *AsToll5A* 的表达量受到极显著抑制($P<0.001$)。

RNAi 干扰使斯氏按蚊中 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 基因表达受到抑制后再感染球孢白僵菌，检验对病原真菌感染的敏感性(图 6：C)。结果表明，RNAi 干扰 *AsToll1A* 或 *AsToll5A* 后按蚊生存曲线显著低于注射 ds*GFP* 的对照组($P<0.01$)，斯氏按蚊抵抗球孢白僵菌侵染的能力被显著削弱。

2.5　RNAi 干扰 *AsToll1A* 或 *AsToll5A* 后对斯氏按蚊肠道菌稳态的影响

利用实时荧光定量 PCR，通过检测细菌标志性的 16S rRNA 的相对含量，确定 RNAi 处理后雌成蚊肠道内的细菌总量。图 6(D)表明，RNAi 抑制 *AsToll1A* 或 *AsToll5A* 的表达后，与对照比较斯氏按蚊肠道内的细菌总量均极显著增加($P<0.0001$)。

2.6　RNAi 干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 基因后对斯氏按蚊抗菌肽基因表达的影响

结果表明(图 6：E)，与对照比较，抑制 *AsToll1A* 后抗菌肽基因 *DEF*1 和 *GAM*1 的表达也随之受到极显著抑制($P<0.0001$)，但 *CEC*1 和 *ATT* 的表达变化不显著。图 6(F)表明，抑制 *AsToll5A* 后抗菌肽基因显著下调的仅有 *GAM*1($P<0.001$)，但 *CEC*1 和 *ATT* 的表达没有显著变化，*DEF*1 的表达反而略有升高($P<0.01$)。因此 *GAM*1 可能同时受到 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 调控。

3　讨论

本研究通过与冈比亚按蚊中 Toll 受体基因家族进行序列比对，鉴定到了斯氏按蚊中 8 个 Toll 受体基因，即 *AsToll1A*，*AsToll5A*，*AsToll*6，*AsToll*7，*AsToll*8，*AsToll*9，*AsToll*10 和 *AsToll*11。它们编码的蛋白均有 Toll 受体家族典型的结构特征，即胞外富

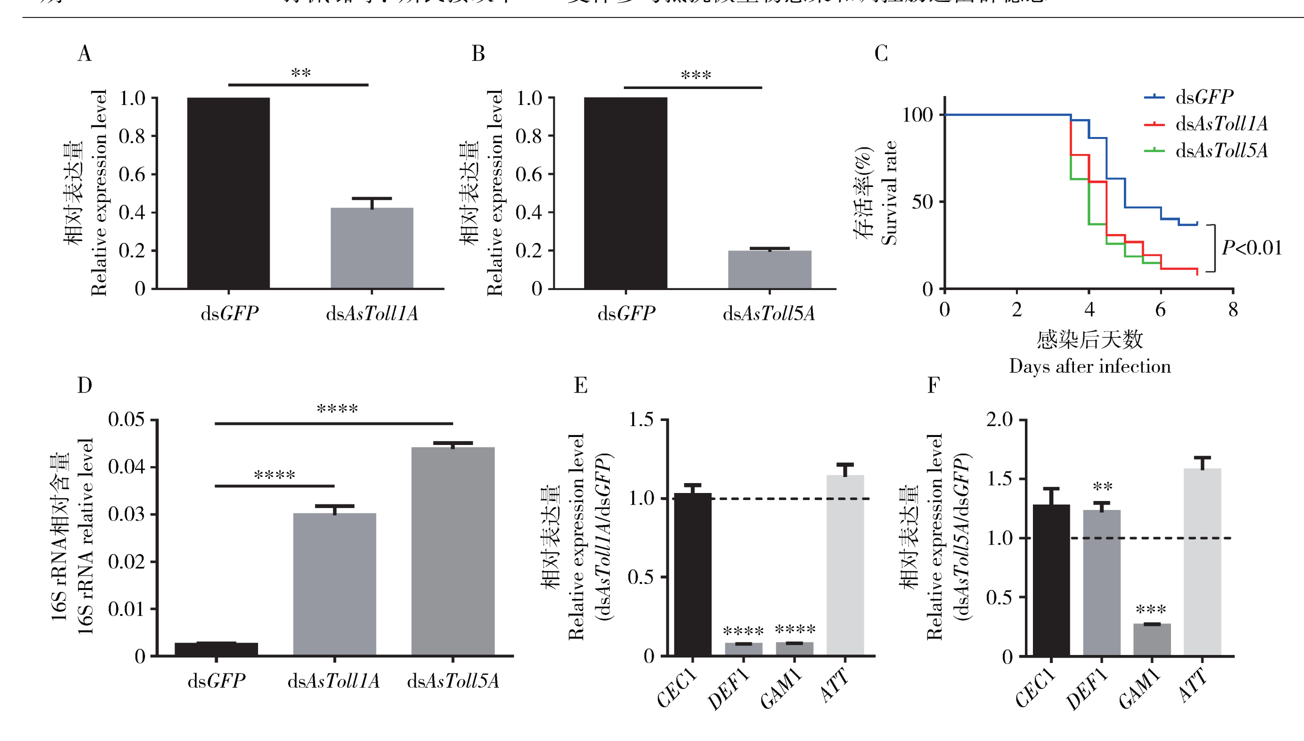


图 6　RNAi 干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 后对斯氏按蚊雌成虫感染真菌后存活率、肠道细菌总量和抗菌肽基因相对表达量的影响

Fig. 6　Effects of RNAi of *AsToll1A* and *AsToll5A* on the adult survival after fungal infection, total gut bacterial load and the relative expression levels of antimicrobial peptide genes in *Anopheles stephensi* female adults

A, B: 分别为 RNAi 干扰 3 d 后脂肪体中 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 的干扰效率 *AsToll1A* and *AsToll5A* silencing efficiency in fat body after RNAi for 3 d, respectively; C: RNAi 干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 后感染球孢白僵菌的斯氏按蚊的存活率 Survival rate of *An. stephensi* infected with *Beauveria bassiana* after RNAi of *AsToll1A* and *AsToll5A*; D: 肠道细菌总量(以 16S rRNA 相对含量表示) Total gut bacterial load (estimated by 16S rRNA relative level); E, F: 分别为 RNAi 干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 后斯氏按蚊主要抗菌肽基因相对表达量 Relative expression levels of antimicrobial peptide genes in *An. stephensi* after RNAi of *AsToll1A* and *AsToll5A*, respectively. 以 ds*GFP* 作为阴性对照;E, F 中基因表达量以 ds*GFP* 对照组中目的基因的表达量为基准;图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差;柱上双星号、三星号、四星号分别表示阴性对照组与该组之间差异显著性为 $P<0.01$, $P<0.001$ 和 $P<0.0001$ (*T* 检验)。ds*GFP* was used as the negative control. The relative expression levels of genes in Figs. E and F are normalized to that in ds*GFP*-treated mosquito. Data in the figure are mean ± *SD* of three independent experiments. Double asterisk, triple asterisk and quadruple asterisk above bars indicate significant difference from the negative control at the 0.01, 0.001 and 0.0001 level, respectively (*T*-test).

含亮氨酸的重复结构域和胞内保守的 TIR 结构域。TIR 结构域在很多与动植物发育和天然免疫相关的基因中均存在,如哺乳动物白介素-1 受体(the interleukin-1 receptor, IL-1R)家族和植物抗病基因,它可以与接头分子上相应的区域互作,进而激活通路中的下游元件发挥作用(Imler and Hoffmann, 2001; Dunne and O'Neill, 2003)。通过使用氨基酸序列建立斯氏按蚊与冈比亚按蚊、埃及伊蚊、黑腹果蝇的 Toll 家族系统发育进化树,确定了斯氏按蚊的 Toll 受体与冈比亚按蚊有很高的相似性,但是斯氏按蚊中没有与冈比亚按蚊 AgToll1B 和 AgToll5B 同源的受体,也没有与果蝇 18-wheeler(即 Toll-2)、MstProX(即 Toll-3)和 Toll-4 同源的受体。Toll 受体家族基因在结构和进化上具有如此强的保守性,与其作为免疫信号通路中关键识别受体这一重要功能密不可分。

脂肪体是昆虫系统免疫的重要器官,能合成并分泌产生多种如抗菌肽等免疫蛋白,以抵抗病原微生物侵染(Buchon *et al*., 2014)。在斯氏按蚊脂肪体中表达量最高的 Toll 受体基因是 *AsToll1A* 和 *AsToll5A*,其余 Toll 受体基因的表达量相比而言微乎其微。这暗示了 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 可能在免疫中发挥了重要作用。斯氏按蚊感染球孢白僵菌和革兰氏阴性细菌胡萝卜软腐欧文氏菌均会诱导 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 的表达。Toll 信号通路被认为主要参与昆虫抵抗真菌的侵染,但果蝇中的研究通常认为 Toll 受体并不参与抵抗革兰氏阴性细菌侵染(Hoffmann and Reichhart, 2002)。虽然埃及伊蚊中也发现被真菌侵染后 *AaToll1A*, *AaToll5A* 和 *AaToll5B* 在脂肪体中表达量会增加,但是受实验条

件所限，无法明确埃及伊蚊被革兰氏阴性细菌侵染后 Toll 受体基因是否发生变化(Shin *et al*., 2006)。我们的研究表明，*AsToll1A* 和 *AsToll5A* 一方面在响应病原真菌侵染过程中具有功能上的保守性，另一方面，在斯氏按蚊受到革兰氏阴性细菌侵染时也有响应(图 4 和 5)，这暗示 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 可能在抑制革兰氏阴性细菌方面也有作用。进一步研究表明，抑制 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 的表达后，雌性斯氏按蚊对球孢白僵菌感染更加敏感，死亡速率显著增加，证明 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 参与斯氏按蚊抵抗病原真菌的感染。此外，我们还检测到干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 后，按蚊肠道内的细菌总量显著增加，这一结果表明 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 在调控以革兰氏阴性细菌为主的肠道菌群稳态方面也发挥了重要作用。

RNAi 干扰 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 后下游的抗菌肽基因表达也受到影响(图 6: E, F)。ds*AsToll1A* 实验组按蚊中抗菌肽基因 *DEF*1 和 *GAM*1 表达量显著降低，ds*AsToll5A* 实验组中 *GAM*1 表达量显著降低。Toll 受体的主要功能是传递病原入侵的信号到胞内，激活下游的转录因子开启抗菌肽基因的转录。降低 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 表达后 Toll 信号通路不能被正常激活，难以表达足量的抗菌肽基因以应对病原入侵，因此蚊子对病原菌更加易感。

本研究初步探明了斯氏按蚊中 Toll 受体家族基因 *AsToll1A* 和 *AsToll5A* 在抵抗病原真菌侵染过程中的功能，以及它们在响应革兰氏阴性细菌感染和调控肠道菌稳态方面的重要作用，但是其上游配体蛋白尚不明确。进一步探索按蚊免疫过程中的关键基因，对研发媒介昆虫生物防治新策略、阻断蚊媒疾病传播有十分重要的意义。

参考文献 (References)

Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C, 1985a. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell*, 42(3): 791–798.

Anderson KV, Jurgens G, Nüsslein-Volhard C, 1985b. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell*, 42(3): 779–789.

Bartholomay LC, Michel K, 2018. Mosquito immunobiology: the intersection of vector health and vector competence. *Annu. Rev. Entomol*., 63: 145–167.

Buchon N, Silverman N, Cherry S, 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster* – from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat. Rev. Immunol*., 14(12): 796–810.

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu JN, Zheng LB, Bork P, Kafatos FC, 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591): 159–165.

Duneau DF, Kondolf HC, Im JH, Ortiz GA, Chow C, Fox MA, Eugénio AT, Revah J, Buchon N, Lazzaro BP, 2017. The Toll pathway underlies host sexual dimorphism in resistance to both Gram-negative and Gram-positive bacteria in mated *Drosophila*. *BMC Biol*., 15(1): 124–140.

Dunne A, O'Neill LAJ, 2003. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci. STKE*, 2003(171): re3.

Etang J, Pennetier C, Piameu M, Bouraima A, Chandre F, Awono-Ambene P, Marc C, Corbel V, 2016. When intensity of deltamethrin resistance in *Anopheles gambiae s. l.* leads to loss of long lasting insecticidal nets bio-efficacy: a case study in north Cameroon. *Parasit. Vectors*, 9(1): 132–141.

Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J, 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416(6881): 640–644.

Hemingway J, Ranson H, 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol*., 45: 371–391.

Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol*., 3(2): 121–126.

Horton AA, Lee Y, Coulibaly CA, Rashbrook VK, Cornel AJ, Lanzaro GC, Luckhart S, 2010. Identification of three single nucleotide polymorphisms in *Anopheles gambiae* immune signaling genes that are associated with natural *Plasmodium falciparum* infection. *Malar. J*., 9: 160.

Imler JL, Hoffmann JA, 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol*., 11(7): 304–311.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA, 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6): 973–983.

Luna C, Hoa NT, Zhang J, Kanzok SM, Brown SE, Imler JL, Knudson DL, Zheng L, 2003. Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol*., 12(1): 67–74.

Luna C, Wang XL, Huang YM, Zhang JA, Zheng LB, 2002. Characterization of four Toll related genes during development and immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 32(9): 1171–1179.

Luo C, Shen B, Manley JL, Zheng L, 2001. Tehao functions in the Toll pathway in *Drosophila melanogaster*: possible roles in development and innate immunity. *Insect Mol. Biol*., 10(5): 457–464.

Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J, 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414(6865): 756–759.

Nüsslein-Volhard C, Lohs-Schardin M, Sander K, Cremer C, 1980. A dorso-ventral shift of embryonic primordia in a new maternal-effect mutant of *Drosophila*. *Nature*, 283(5746): 474-476.

Ooi JY, Yagi Y, Hu XD, Ip YT, 2002. The *Drosophila* Toll-9 activates a constitutive antimicrobial defense. *EMBO Rep*., 3(1): 82-87.

Shin SW, Bian GW, Raikhel AS, 2006. A Toll receptor and a cytokine, Toll5A and Spz1C, are involved in Toll antifungal immune signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem*., 281(51): 39388-39395.

Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL, 2000. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(19): 10520-10525.

WHO, 2018. World Malaria Report 2018. World Health Organisation, Geneva.

Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, Eldon ED, 1997. The 18-*wheeler* mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J*., 16(20): 6120-6130.

（责任编辑：马丽萍）